



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 17 837 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 30/26**  
G 01 N 30/06  
B 01 D 15/08  
G 01 N 30/48

②① Aktenzeichen: 197 17 837.5  
②② Anmeldetag: 26. 4. 97  
④③ Offenlegungstag: 29. 10. 98

**DE 197 17 837 A 1**

⑦① **Anmelder:**  
Feuerstein, Thomas, Dr., 79102 Freiburg, DE;  
Knörle, Rainer, Dr., 79102 Freiburg, DE; Limberger,  
Norbert, Dr., 79102 Freiburg, DE

⑦② **Erfinder:**  
gleich Anmelder

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **HPLC-Säule zur Untersuchung der Melaninaffinität von Substanzen**

⑤⑦ Die Bindung von Substanzen an Melanin ist in biologischen Systemen für eine Vielzahl pathophysiologischer oder toxischer Effekte verantwortlich. Hieraus resultiert die Frage nach Möglichkeiten, Melaninaffinitäten von Wirkstoffen (z. B. Medikamenten) zu prüfen und gebundene schädliche Substanzen aus ihrer Melaninbindung zu verdrängen. Die Melaninbindung wurde bislang mittels Anlagerung radioaktiver Liganden und Radioaktivitätsmessung des Ligand-Melaninkomplexes analysiert. Der Vorteil einer Affinitätschromatographischen Analyse des Bindungsverhaltens beruht auf der Verwendung von nicht radioaktiven Substanzen, die u. a. keine Strahlungsfährdung aufweisen. Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens einer Substanz an Melanin werden definierte Mengen der Substanz auf die Säule aufgetragen und die zugehörigen Retentionen bei isokratischer Elution ermittelt. Diese Retentionen charakterisieren die Affinität der Substanz. Die Analyse von Wechselwirkungen verschiedener Stoffe in ihrer Melaninbindung erlaubt es, Substanzen zu identifizieren, die andere Stoffe aus ihrer unerwünschten Melaninbindung verdrängen. Prüfung der Affinität von Substanzen zu Melanin und ihrer gegenseitigen Verdrängung aus der Melaninbindung.

**DE 197 17 837 A 1**

Melanine sind Biopolymere von teilweise variabler kovalenter Struktur. Ihre einzelnen Schichten bauen sich aus Pyrrolringen mit phenolischen OH-Gruppen, chinoiden Gruppen und Carboxylfunktionen auf. Nach dem Schwefelgehalt werden sie in die schwefelfreien schwarzen Eumelanine und die schwefelhaltigen gelben bis rotbraunen Phäomelanine eingeteilt. Die häufigste Vorstufe beider Melaninarten ist L-DOPA, das nach Oxidation und nachfolgender Zyklisierung zu Eumelanin polymerisiert. Die Bildung von Phäomelaninen beruht auf dem Einbau schwefelhaltiger Gruppen, hauptsächlich von L-Cystein oder Glutathion, in das polymerisierende Melanin (Prota 1995).

Die Bindung von Substanzen an Melanin ist in biologischen Systemen für eine Vielzahl pathophysiologischer oder toxischer Effekte verantwortlich. Besondere Bedeutung erhält beispielsweise die Melaninaffinität von Wirkstoffen bei Langzeitbehandlung mit Neuroleptika, karzinogenen Substanzen oder Antimalariamitteln (Larsson 1993).

So ist z. B. das Retina-schädigende Malariumittel Chloroquin noch ein Jahr nach einmaliger i. v. Injektion in erheblichen Konzentrationen in der Retina pigmentierter Tiere nachweisbar (Lindquist 1973), so daß sich seine Retina-toxischen Effekte durch die Akkumulation im Retinamelanin und die andauernde, wenn auch geringe Freisetzung aus diesem Speicher erklären lassen.

Hieraus ergibt sich unmittelbar die Frage nach Möglichkeiten, die Melaninaffinität von Wirkstoffen zu prüfen und gebundene schädliche Substanzen wieder aus ihrer Melaninbindung zu verdrängen.

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung der Melaninaffinität verschiedener Substanzen liegt in der Tatsache, daß (1) Eumelanine in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlöslich sind, (2) spektroskopische Untersuchungen aufgrund der starken Eigenabsorption von Melanin nicht durchführbar sind und (3) Melanine durch ihre variable kovalente Struktur eine deutliche Heterogenität des Molekulargewichtes aufweisen.

Aufgrund dieser Einschränkungen wurde bislang die Melaninbindung von Wirkstoffen, vor allem von Medikamenten und Giften, mittels radioaktiv markierter Liganden mit nachfolgender Radioaktivitätsmessung durchgeführt.

Die in Patentanspruch 1 angegebene Erfindung umgeht das grundsätzliche Problem der Vergleichbarkeit radioaktiv markierter und nicht markierter Substanzen. Der Vorteil einer Affinitätschromatographischen Analyse des Bindungsverhaltens beruht auf der Verwendung von "nativen", nicht radioaktiv markierten Substanzen. Das Problem der Radiolyse entfällt. Auch ist jegliches Strahlenrisiko infolge eines Umgangs mit radioaktiven Stoffen ausgeschlossen.

Darüberhinaus ist die radioaktive Markierung mit einem erheblichen, d. h. teuren Synthesaufwand verbunden. Native Substanzen sind deswegen sehr viel billiger als entsprechende radioaktiv markierte Stoffe, was eine gewerbliche Verwendung der zu patentierenden Erfindung fördert.

In der Literatur wurde bereits eine Synthesemethode für ein Affinitätsgel (Säulenmaterial), ausgehend von käuflich erhältlichem L-DOPA-Melanin, beschrieben (Ibrahim und Aubry 1995). Eigene Experimente zeigten, daß diese Methode jedoch in vielen Schritten nicht reproduzierbar ist. Beispielsweise beschreiben Ibrahim und Aubry (1995) die Lösung von getrocknetem L-DOPA-Melanin in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 50 mg/ml. Die Lösung ist nicht nachvollziehbar und widerspricht jeglicher Literatur, beispielsweise Prota (1988). Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wurde eine grundlegend veränderte Synthesemethode entwickelt. Der Gesichtspunkt der Kostenreduktion wurde auch hier im Hinblick auf eine künftige gewerbliche Anwendung berücksichtigt.

Die dieser Patentanmeldung zugrunde liegende Synthesvorschriften für die Herstellung von Melaninen (Eumelanin und Phäomelanin) und die kovalente Kopplung der Melanine an Kieselgel (als Säulenmaterial) sind folgende:

#### Herstellung von Eumelanin

L-DOPA (1 g, 5.07 mmol) wird in 400 ml eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers (pH 8.0) gelöst und eine Woche bei Raumtemperatur und normalem Tageslicht stehen gelassen. Die Autooxidation führt hierbei zu kolloidal gelöstem synthetischem Eumelanin. Im Gegensatz zu der Synthesvorschrift von Ibrahim und Aubry (1995), die von getrocknetem, kommerziell erhältlichem L-DOPA-Melanin ausgeht, liegt bei unserem Verfahren kolloidal gelöstes Eumelanin vor. Dieses zeichnet sich durch eine relativ konstante Teilchengröße von etwa 10 nm Durchmesser aus (Zajac et al. 1994); die Suspension von getrocknetem, unlöslichem L-DOPA-Melanin liefert keine auch nur annähernd homogene Partikelgröße, sondern wesentlich größere Teilchen ( $>> 10 \text{ nm } \varnothing$ ). Die entscheidenden Vorteile der Homogenität relativ kleiner Teilchen um 10 nm sind (1) die stabilere Kopplung infolge von zahlreicheren Bindungsarmen pro Kopplungspartner (Kieselgel und Melanin) im Vergleich zu einem viel größeren Melanin-Partikel als Kopplungspartner und (2) die dadurch bedingte Homogenität des Säulenmaterials selbst. Diese Homogenität des Säulenmaterials entscheidet über die Qualität einer Chromatographiesäule.

#### Herstellung von Phäomelanin

Zur Synthese von Phäomelanin werden äquimolare Mengen von L-DOPA (1 g, 5.07 mmol) und L-Cystein (1.54 g, 5.07 mmol) in 400 ml eines 100 mM Kaliumphosphatpuffers (pH 11.0) gelöst und eine Woche bei Raumtemperatur und normalem Tageslicht stehen gelassen. Die Autooxidation führt hierbei zu gelöstem synthetischem Phäomelanin. (Phäomelanine unterscheiden sich von Eumelaninen durch ihre Wasserlöslichkeit, Prota 1995.)

#### Kopplung der Melanine an Kieselgel

Die kovalente Kopplung des kolloidal gelösten Eumelanins und des gelösten Phäomelanins erfolgt durch Ausbildung von Peptidbindungen zwischen den Carboxylatgruppen der Melanine und den Aminofunktionen des als Trägermaterial dienenden Aminopropylkieselgels (APS, Polygosil 60-10 NH<sub>2</sub> der Firma Macherey-Nagel). Diese Peptidbindungen werden unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Methiodid (EDC), einem in der Peptidsynthese gebräuchlichen und kostengünstigen Reagenz, gebildet.

Zur Kopplung des Eumelanins werden 60 ml der kolloidalen Lösung (entsprechend 150 mg Eumelanin) mit 300 ml Wasser versetzt; nach Zugabe von 3 g APS werden 75 mg EDC zugesetzt. Der Ansatz wird unter Lichtausschluß für 18 h geschüttelt. Die erfolgreiche Kopplung erkennt man dadurch, daß sich der Überstand entfärbt.

Zur Kopplung des Phäomelanins werden 60 ml der Lösung (entsprechend 150 mg Phäomelanin) mit 1 M HCl auf pH 8.0 gebracht und mit Wasser auf 300 ml verdünnt. Das weitere Verfahren entspricht der o.a. Vorschrift für Eumelanin.

#### Aufarbeitung der Säulenmaterialien

Nach Sedimentierung wird das entstandene Gel (etwa 3 g) mehrfach mit einem Gemisch (ca. 50 ml) aus 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) und 10% n-Propanol (v/v) aufgeschlämmt. Anschließend wird das Gel dreimal mit je 50 ml DMSO/Wasser (1 : 1), sechsmal mit je 50 ml Wasser und sechsmal mit je 50 ml Methanol gespült.

Das fertige Säulenmaterial wird in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) und 10% n-Propanol (v/v) bei 4°C gelagert.

Zum Packen der Säule wird das Säulenmaterial in Eluent (100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) und 10% n-Propanol (v/v)) aufgeschlämmt und durch einen Einfüllstutzen mit einer Flußrate von 4 ml/min in die Säule gepreßt. Fig. 1 zeigt die Säule und den Einfüllstutzen im Maßstab 1 : 1.

#### Einsatz der Säule zur Charakterisierung der Melaninaffinität verschiedener Stoffe

Am Beispiel der geprüften Eumelaninaffinitäten des Neuroleptikums Haloperidol und des Antidepressivums Desipramin soll der Gebrauch der zum Patent angemeldeten Säule beschrieben werden:

2 ml einer äquimolaren Lösung von Haloperidol und Natriummaleat oder Desipramin und Natriummaleat im Eluenten werden auf die Säule aufgetragen. Die Konzentrationsbereiche der Substanzen reichen von 5 bis 80 µM, entsprechend einer auf die Säule aufgetragenen Teilchenzahl  $N_0$  von 10 bis 160 nmol. Bei isokratischer Elution (Flußrate 2 ml/min) wird der Beginn der Wanderungsfront (Retention) der Substanzen ermittelt. In Abwandlung der bisher in der Literatur (Ibrahim und Aubry 1995; Radwanska et al. 1995) beschriebenen Methode wird durch den Einsatz von Natriummaleat das Leervolumen der Säule in jedem Lauf bestimmt, so daß die für die Charakterisierung der Bindung notwendige Retention auf der Säule für jede Konzentration von Haloperidol oder Desipramin durch Vergleich mit dem jeweiligen Leervolumen exakt bekannt ist.

Aus den ermittelten Retentionen wird jeweils eine Bindungskurve erstellt. Hierbei beschreibt  $V$  das Retentionsvolumen der untersuchten Substanz Haloperidol oder Desipramin (Produkt aus Flußrate und Retentionszeit);  $V_0$  ist das aus der Retention von Natriummaleat berechnete Leervolumen der Säule. Die Differenzen  $V - V_0$  werden gegen die Teilchenzahl von Haloperidol oder Desipramin auf der Säule als Datenpunkte aufgetragen. An diese Meßpunkte wird in einem deskriptiven Ansatz die Funktion  $D + 1/(N_0^c)$  mittels nichtlinearer Regressionsanalyse angepaßt. Die zu schätzenden Parameter der entstehenden Kurven sind  $c$  und  $D$ ; sie charakterisieren die Affinität von Haloperidol oder Desipramin zu Melanin (Fig. 2).

Der Vergleich der Parameter  $c_{\text{Haloperidol}}$  und  $D_{\text{Haloperidol}}$  mit  $c_{\text{Desipramin}}$  und  $D_{\text{Desipramin}}$  läßt aufgrund der sich nicht überlappenden 95%-Konfidenzintervalle ( $CI_{95}$ ) der Schätzer klar erkennen, daß die Eumelaninaffinitäten der untersuchten Substanzen unterschiedlich sind.

#### Einsatz der Säule zur Charakterisierung der Wechselwirkungen mehrerer Stoffe mit Melanin

Am Beispiel der Melanin-Bindung des Antidepressivums Desipramin in Gegenwart des Neuroleptikums Haloperidol soll die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Substanzen beschrieben werden:

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung wird die Affinitätsäule mit einer Haloperidollösung einer definierten Konzentration im Eluenten (z. B. 1 µM) äquilibriert. Dann werden 2 ml einer äquimolaren Lösung von Desipramin und Natriummaleat im Eluenten auf die Säule aufgetragen. Die Konzentrationsbereiche beider Substanzen reichen von 5 bis 80 µM, entsprechend einer auf die Säule aufgetragenen Teilchenzahl  $N_0$  von jeweils 10 bis 160 nmol. Bei isokratischer Elution in Gegenwart von Haloperidol (1 µM, Flußrate 2 ml/min) werden die Retentionszeiten von Natriummaleat und Desipramin ermittelt.

Aus den ermittelten Retentionen wird eine Bindungskurve von Desipramin in Gegenwart von Haloperidol erstellt. Durch Vergleich der zu schätzenden Parameter  $c$  und  $D$  in Abwesenheit (vgl. Fig. 2) und Gegenwart von Haloperidol lassen sich Rückschlüsse auf die Veränderung des Bindungsverhaltens von Desipramin durch Haloperidol und somit auf die Wechselwirkungen zwischen Desipramin und Haloperidol bei der Melanin-Bindung ziehen (Fig. 3; beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinate in Fig. 2 und 3).

Im folgenden sind die Bindungsparameter zu Fig. 2 und 3 aufgeführt:

## Bindungsparameter für Haloperidol an Melanin

Parameter	Schätzer	approximativer Standardfehler	95%-Konfidenzintervall (CI95)
-----------	----------	-------------------------------	-------------------------------

<b>c</b>	0.274	0.004	[0.264, 0.282]
----------	-------	-------	----------------

<b>D</b>	-51.587	8.245	[-69.212, -33.539]
----------	---------	-------	--------------------

## Bindungsparameter für Desipramin an Melanin

Parameter	Schätzer	approximativer Standardfehler	95%-Konfidenzintervall (CI95)
-----------	----------	-------------------------------	-------------------------------

<b>c</b>	0.172	0.002	[0.168, 0.176]
----------	-------	-------	----------------

<b>D</b>	-9.739	0.601	[-11.040, -8.418]
----------	--------	-------	-------------------

## Bindungsparameter für Desipramin an Melanin unter 1 µM Haloperidol

Parameter	Schätzer	approximativer Standardfehler	95%-Konfidenzintervall (CI95)
-----------	----------	-------------------------------	-------------------------------

<b>c</b>	0.147	0.002	[0.142, 0.152]
----------	-------	-------	----------------

<b>D</b>	-5.870	0.525	[-7.002, -4.711]
----------	--------	-------	------------------

## Literatur

- Ibrahim H, Aubry AF (1995) Development of a melanin-based high-performance liquid chromatography stationary phase and its use in the study of drug-melanin binding interactions. *Anal Biochem* 229 : 272-277,  
 Larsson BS (1993) Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res* 6 : 127-133,  
 Lindquist NG (1973) Accumulation of drugs on melanin. *Acta Radiol Diagn* 325 : 1-92,  
 Protá G (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev* 8 : 525-556,  
 Protá G (1995) The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst* 64 : 93-148,  
 Radwanska A, Frackowiak T, Ibrahim H, Aubry AF, Kaliszan R (1995) Chromatographic modelling of interactions between melanin and phenothiazine and dibenzazepine drugs. *Biomed Chromatogr* 9 : 233-237,  
 Zajac GW, Gallas JM, Cheng J, Eisner M, Moss SC, Alvarado SA (1994) The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. *Biochim Biophys Acta* 1199 : 271-278.

## Patentansprüche

1. Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)-Affinitätssäule zur Untersuchung der Affinität von Substanzen zu Melanin, **dadurch gekennzeichnet**, daß die stationäre Phase (Säulenmaterial) aus mit Kieselgel kovalent verknüpftem Eumelanin oder Phäomelanin besteht. Das verwendete Eumelanin wird in vitro aus L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) synthetisiert; Phäomelanin wird in vitro aus L-DOPA und Cystein synthetisiert. Die chemische Verknüpfungsmethode erlaubt auch den Einsatz von Melaninen biologischen Ursprungs, wie z. B. dem Melanin der Netzhaut des Auges.

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens (entsprechend der Affinität) einer bestimmten Substanz an Melanin werden definierte Mengen der Substanz auf die Säule aufgetragen und die zugehörigen Retentionen bei isokratischer Elution ermittelt. Diese Retentionen hängen von den aufgetragenen Mengen ab und charakterisieren die Affinität der Substanz. Das Eigenvolumen der Säule wird durch Auftragen von nicht-melaninaffinem Natriummaleat bei jedem Lauf bestimmt.

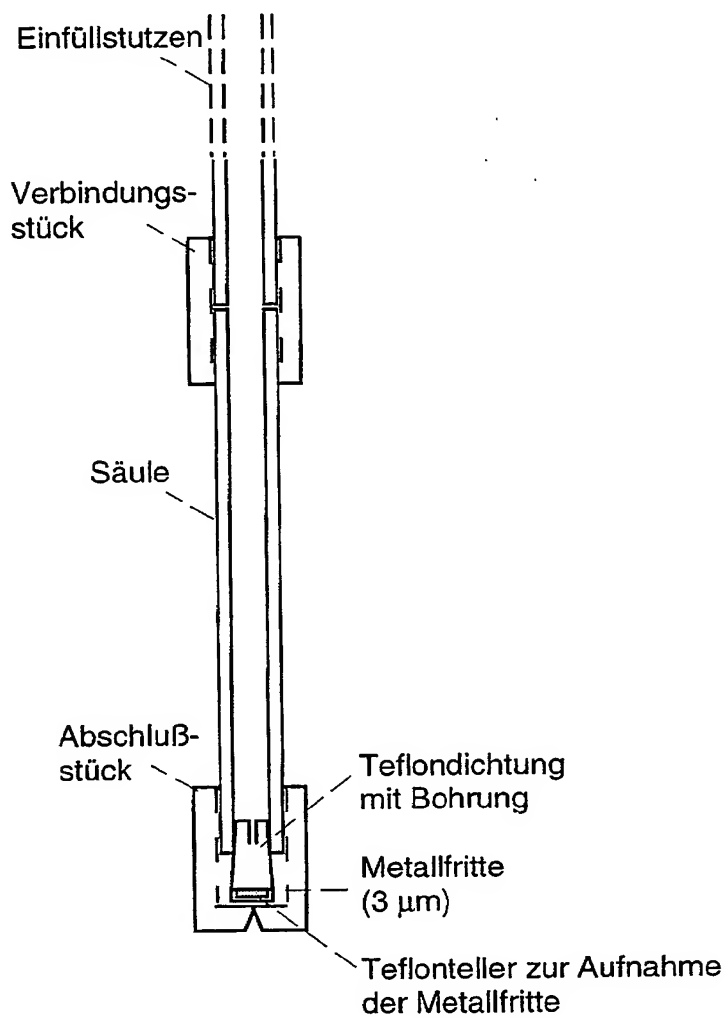
Die Prüfung der Affinität von Substanzen zu Melanin ist deswegen wichtig, weil Wirkstoffe in biologischen Systemen (z. B. Medikamente) durch ihre Bindung an Melanin ihre gewünschte Wirkung verlieren können. Hierdurch können sich auch Wirkungen verändern, so daß neuartige, unerwünschte Nebenwirkungen entstehen.

2. Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)-Affinitätssäule nach Patentanspruch 1, zur Untersuchung der Wechselwirkung mehrerer Wirkstoffe mit Melanin, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des an Melanin angelagerten Wirkstoffs A durch den Wirkstoff B beeinflusst wird. Dazu werden nach Äquilibration der Säule mit Wirkstoff A definierte Mengen des Wirkstoffs B auf die Säule aufgetragen und die zugehörigen Retentionen des Wirkstoffs B bei isokratischer Elution ermittelt, wobei der Eluent nach wie vor Wirkstoff A in konstanter Konzentration enthält. Die Retentionen des Wirkstoffs B hängen von den aufgetragenen Mengen ab und charakterisieren die Affinität des Wirkstoffs B zu Melanin in Gegenwart von Wirkstoff A.

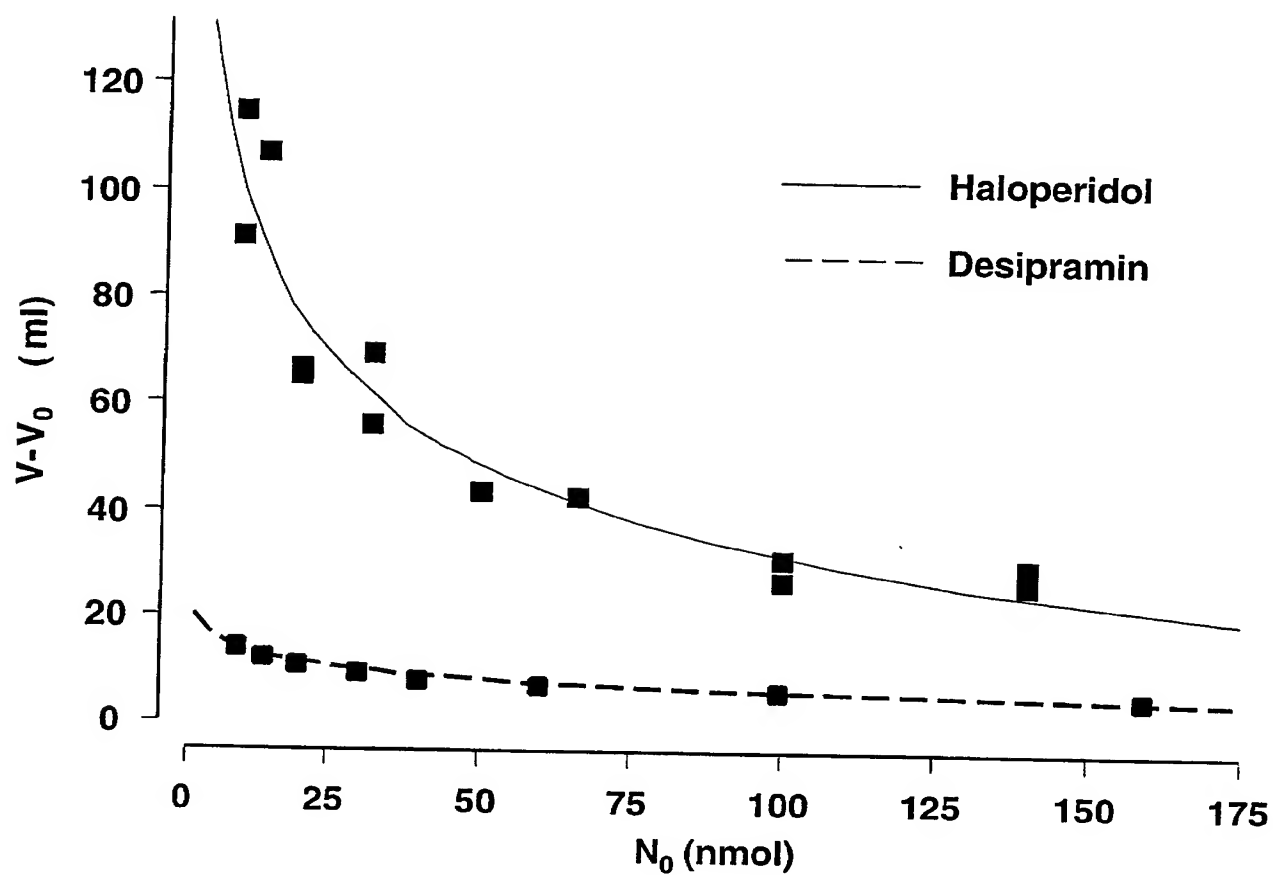
Die Prüfung der Wechselwirkungen mehrerer Wirkstoffe mit Melanin ist deswegen wichtig, weil sich die gewünschten Wirkungen oder die unerwünschten Nebenwirkungen eines Stoffes (z. B. eines Medikaments) durch seine Wechselwirkungen mit anderen Stoffen und Melanin verändern können.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Figur 1



Figur 2



Figur 3

